

UNIVERSIDAD DE PANAMA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION Y POSTGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TENOLOGIA
PROGRAMA DE MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE GENES Y HAPLOTIPOS DEL
SISTEMA DE ANTIGENO LEUCOCITARIO HUMANO UTILIZANDO LA
REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SONDAS ALELO ESPECIFICAS

LUIS DEMETRIO ORTIZ SEGURA

CEDULA 3 111 110

COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TITULO DE MAESTRIA EN CIENCIAS
BIOLOGICAS CON ESPECIALIZACION EN GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

PANAMA REPUBLICA DE PANAMA

2017

57



Título de la Tesis:

"DETERMINACIÓN DE LA FRECUENCIA DE GENES Y HAPLOTIPOS DEL SISTEMA DE ANTÍGENO LEUCOCITARIO HUMANO UTILIZANDO LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA Y SONDAS ALELO ESPECÍFICAS"

03 APR 2018


TESIS

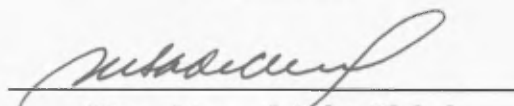
Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas con Especialización en Genética y Biología Molecular

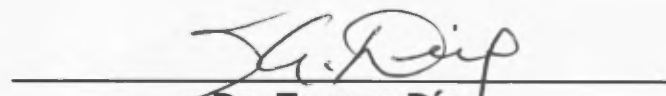
Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología


APROBADO POR:


Doctor Carlos Ramos
Presidente


Dra. Magaly de Chial
Miembro


Dr. Tomas Díez
Miembro

REFRENDADO POR:


**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

del aula

Obs. gano

INDICE GENERAL

RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCION	9
FUNDAMENTACION TEORICA	12
1 Complejo Mayor de Histocompatibilidad (HLA)	12
2 Localizacion Cromosomica del sistema HLA	13
3 Genes similares a clase I codificados fuera del sistema HLA	18
4 Estructura de los antígenos HLA de clase I	18
5 Estructura de los antígenos HLA de clase II	23
6 Nomenclatura HLA	26
7 Asignacion haplotipos HLA	27
8 Variabilidad inmunogenetica	27
9 Grupos etnicos de Panama	31
10 Tecnologia Luminex (Tepnel Lifecodes)	31
OBJETIVOS	37
METODOLOGIA	39
1 Tipo de Estudio	40
2 Universo	40
3 Poblacion	40
4 Criterios de Inclusion y Exclusion	40
5 METODOS	41
5 1 EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS (ADN)	42
5 2 MEDICION DE LA CONCENTRACION DE ADN	42
5 3 CONTROL DE CALIDAD	43
5 4 IDENTIFICACION DE LOS GENES HLA	
PCR SSP	43
PCR SSO	44
RESULTADOS	47
DISCUSION	54

CONCLUSIONES	59
AGRADECIMIENTOS	61
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°1 PORCENTAJE DE ALELOS RECONOCIDOS POR

LA OMS DETECTADOS EN NUESTRA POBLACION 48

CUADRO N°2 FRECUENCIA DE ALELOS HLA A* 48

CUADRO N°3 FRECUENCIA DE ALELOS HLA B* 49

CUADRO N°4 FRECUENCIA DE ALELOS HLA C* 50

CUADRO N°5 FRECUENCIA DE ALELOS HLA DRB1* 50

CUADRO N°6 FRECUENCIA DE ALELOS HLA DQB* 51

CUADRO N°7 FRECUENCIA DE ALELOS HLA DPB* 51

CUADRO N°8 HAPLOTIPOS MAS FRECUENTES

EN NUESTRA POBLACION 52

INDICE DE FIGURAS

Fig N°1 Localizacion Cromosomica del sistema HLA	14
Fig N°2 Genes de la region HLA de clase I	15
Fig N°3 Estructura proteica de la molecula HLA de clase I	19
Fig N°4 Disposicion de los bolsillos de union al peptido en la molecula HLA de clase I	23
Fig N°5 Figura esquematica de Estructura de los antigenos HLA de clase II	25
Fig N°6 haplotipos caracteristicos del sistema HLA en distintas poblaciones humanas	31

ABREVIATURAS

- 1 HLA Antígeno Leucocitario Humano
- 2 MHC Complejo Mayor de Histocompatibilidad (por sus siglas en inglés)
- 3 ADN Ácido Desoxirribonucleico
- 4 PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
- 5 SSP Secuencia específica de Cebadores
- 6 SSO Secuencia específica de Oligonucleótidos (sondas alelo específicas)
- 7 dNTPs Trifosfatos de desoxinucleosidos
- 8 taq polimerasa Enzima polimerasa termo acuática
- 9 AP Antes del Presente
- 10 fr frecuencia del alelo
- 11 n número de alelos
- 12 OMS Organización Mundial de la Salud
- 13 aa Residuos de aminoácidos

RESUMEN

La frecuencia de los alelos HLA y la presencia de los haplotipos mas frecuentes en una muestra de 369 individuos pertenecientes a los diferentes programas de trasplante de organos de la Republica de Panama fueron determinadas. Se encontro que los alelos mas frecuentes fueron A*02(23.8%) A*24 (23.3%) B*35(21.2%) B*40(16.3%) C*03(22.9%) C*04(19.8%) C*07(18.8%). Ademàs para HLA Clase-II son DRB1*04(23.6%) DRB1*07(8.0%) DRB1*13(11.9%) DQB1*03(50.4%) DQB1*06(12.9%) DQB1*02 (12.0%) DPB1*04 (42.7%) DPB1*14 (17.3%). Con relacion a los haplotipos los mas frecuente fueron (A24 B40 DR04) 6.1% (A24 B35 DR04) 5.0% (A02 B35 DR04) 4.2% (A24 B35 DR14) 4.2%. Los haplotipos mas frecuentes encontrados fueron (A24 B40 DR04) 6.1% (A24 B35 DR04) 5.0% (A02 B35 DR04) 4.2% (A24 B35 DR14) 4.2%. La informacion generada en este estudio podria ser utilizada para hacer pronostico de tiempo en lista de espera de los diferentes programas de trasplante en nuestro sistema de salud publica.

ABSTRACT

The frequency of the HLA alleles and the presence of the most frequent haplotypes in a sample of 369 individuals belonging to the different organ transplant programs of the Republic of Panama were determined. It was found that the most frequent alleles were A*02(23.8%) A*24 (23.3%) B*35(21.2%) B*40(16.3%) C*03(22.9%) C*04(19.8%) C*07(18.8%). Además para HLA Clase II son DRB1*04(23.6%) DRB1*07(8.0%) DRB1*13(11.9%) DQB1*03(50.4%) DQB1*06(12.9%) DQB1*02 (12.0%) DPB1*04 (42.7%) DPB1*14 (17.3%). Con relación a los haplotipos los más frecuentes fueron (A24 B40 DR04) 6.1% (A24 B35 DR04) 5.0% (A02 B35 DR04) 4.2% (A24 B35 DR14) 4.2%. The most frequent haplotypes found were (A24 B40 DR04) 6.1% (A24 B35 DR04) 5.0% (A02 B35 DR04) 4.2% (A24 B35 DR14) 4.2%. The information generated in this study could be used to make a forecast of time on the waiting list of the different transplant programs in our public health system.

INTRODUCCION

El éxito de un trasplante es determinado por múltiples factores de los cuales la compatibilidad del sistema de Antígeno Leucocitario Humano (HLA) entre donante y receptor es uno de los más importantes. La supervivencia del Trasplante de riñón se caracteriza en ser mayor mientras más compatibilidad exista con el órgano trasplantado (Moresol *et al* 2013). El grado de histocompatibilidad está determinado por la cantidad de genes HLA similares en ambos individuos (Granados *et al* 2014). De allí que determinar la presencia de dichos genes es crucial en los programas de trasplante. En Panamá se cuenta con varias modalidades de trasplante: a) Trasplante Renal con donante vivo relacionado, en el cual un donador vivo emparentado cede uno de sus riñones a un familiar. La compatibilidad en este programa se determina en los locus HLA A* HLA B* y HLA DRB1*. b) El programa de Trasplante renal con donante Fallecido, en donde un Donante altruista cede sus órganos al estado después de diagnosticado su fallecimiento, los cuales serán implantados en un receptor ubicado en una lista de espera nacional; se le coloca un riñón a cada receptor compatible. Los locus utilizados para determinar la compatibilidad HLA son HLA A* HLA B* HLA DRB1*. c) El programa de injerto de Células pluripotenciales Hematopoyéticas, en el cual se estudian hermanos de doble vínculo (de padre y de madre) los cuales deben ser idénticos en el sistema HLA para los locus HLA A* HLA B* HLA DQB1* HLA C* HLA DPB* HLA DRB1*.

En Panamá la frecuencia de genes del sistema HLA solo ha sido determinada con técnicas que detectan antígenos de superficie, lo que no representa la totalidad del polimorfismo y

unicamente describe formas mayores correspondientes a los genes que en ese momento se utilizaban para determinar la compatibilidad en trasplante de organos (Vernaza *et al* 1997)

Las tecnicas de biologia molecular proporcionan una mejor resolucio n de los genes HLA que son reconocidas por la Organizacio n Mundial de la Salud (OMS) (Chang *et al* 2014) por tal motivo la necesidad de tener datos a nivel molecular para fines terapeuticos de trasplante de organos motivo a implementar dichas tecnicas en el Laboratorio Nacional de trasplante Dicho Laboratorio es el encargado de realizar estos estudios para la poblacio n panameña que requiera el servicio

La frecuencia de genes HLA en La poblacio n panameña no ha sido hasta el momento determinada utilizando tecnicas de biologia Molecular Con el desarrollo de diversas tecnicas moleculares ha sido posible el descubrimiento de numerosas y nuevas variantes del sistema HLA Por otra parte las frecuencias de alelos HLA y sus patrones de desequilibrio de ligamiento varian entre diferentes poblaciones humanas (Rodriguez *et al* 2007) Estas variaciones en el polimorfismo HLA es utilizada en estudios antropogenicos en la diferenciacion entre y dentro de mezclas raciales distancias geneticas y patrones de migracion (Marsh 2012)

Fundamento teórico

Fundamento teorico

Complejo Mayor de Histocompatibilidad

(MHC del ingles Major Histocompatibility Complex) es un conjunto de genes altamente polimorficos cuyos productos se expresan en la superficie celular las moleculas HLA de clase I se expresan en todas las celulas nucleadas las moleculas HLA de clase II tienen una expresion mas restringidas (Linfocitos B macrofagos entre otras) y representan un rol importante en la respuesta inmune adaptativa Se considera que estos genes estan presentes en todos los vertebrados en el hombre recibe el nombre de sistema HLA (del ingles Human Leukocyte Antigen) El sistema HLA descubierto en los años 50 (Chang *et al* 2014) en una situacion artificial de trasplante de tejidos de un individuo a otro

Las proteinas que codifican estos genes se denominan moleculas HLA o antígenos HLA que son los que determinan el rechazo o aceptacion de un injerto (Guzman 2009) Asi dos individuos que expresen en sus celulas el mismo HLA aceptan tejidos trasplantados uno del otro e individuos que difieran en estos loci lo rechazaran Aunque el papel de estas moleculas en el rechazo de trasplantes tiene un considerable interes la funcion primordial de las proteinas codificadas por este complejo genetico es la presentacion antigenica (respuesta inmunologica especifica mediada por linfocitos T)

El papel principal de los genes HLA en la respuesta inmune frente a antígenos fue postulada en 1970 cuando se demostró que los linfocitos T antígeno específicos no reconocían antígenos libres o en forma soluble sino que reconocían porciones de proteínas antigenicas unidas no covalentemente a las moleculas HLA Puesto que estas moleculas son proteinas asociadas a membrana los linfocitos T pueden reconocer antígenos extraños

solamente si estan unidos a la superficie de otras celulas Esta limitacion en la activacion de los linfocitos T es debida a que interaccionan mejor con otras celulas que muestran antigenos asociados a moleculas HLA que en forma soluble El modelo de asociacion del antígeno con la molecula HLA determina el tipo de linfocito T que es estimulado Asi los antigenos unidos a moleculas HLA de clase I estimulan principalmente linfocitos T CD8+ y los unidos a moleculas HLA de clase II estimulan principalmente linfocitos T CD4+ La forma en que estos genes influyen en la respuesta inmune frente a diferentes antigenos viene determinada por la modulacion del repertorio de celulas T maduras realizada por el MHC(Major Histocompatibility Complex por sus siglas en ingles) (Gomez *et al* 2015) De esta manera el sistema inmunologico es capaz de diferenciar lo propio de lo no propio (patogenos) e incluso de lo propio alterado (transformacion tumoral) El sistema HLA es dialelico y codominante Presenta tres características principales es poligenico esta constituido por varios genes clasificados en tres regiones es muy polimorfico (Buhler *et al* 2012) existen multiples alelos para cada locus Los distintos alelos difieren entre si en la habilidad para unir y presentar con mayor eficacia diferentes antigenos proteicos Cada individuo puede tener dos alelos diferentes para cada gen y la mayor parte de los individuos de una poblacion son heterocigotos para cada gen de este sistema presenta desequilibrio de ligamiento es decir diferentes alelos de distintos genes se encuentran en el mismo cromosoma con una frecuencia mayor a la teoricamente esperada en una combinacion al azar Todas estas propiedades hacen que el MHC sea uno de los sistemas geneticos mas complejos y a la vez fascinantes descritos en la naturaleza (Gomez *et al* 2015)

Localizacion Cromosomica del sistema HLA

Este sistema se localiza fisicamente en el brazo corto del cromosoma 6 en la parte distal de la banda 6p21.3 y ocupa una longitud de 4 centimorgan (CM) aproximadamente 4 millones de pares de bases y contiene al menos 200 genes pseudogenes y fragmentos genicos Dependiendo del origen genetico y/o funcionalidad biologica de sus productos el conjunto de genes de esta region tradicionalmente se ha dividido en 2-4 grandes grupos En la

actualidad se admiten tres regiones, aunque la identificación y caracterización constante de nuevos genes no excluye una revisión futura de esta clasificación (ver Fig. 1).

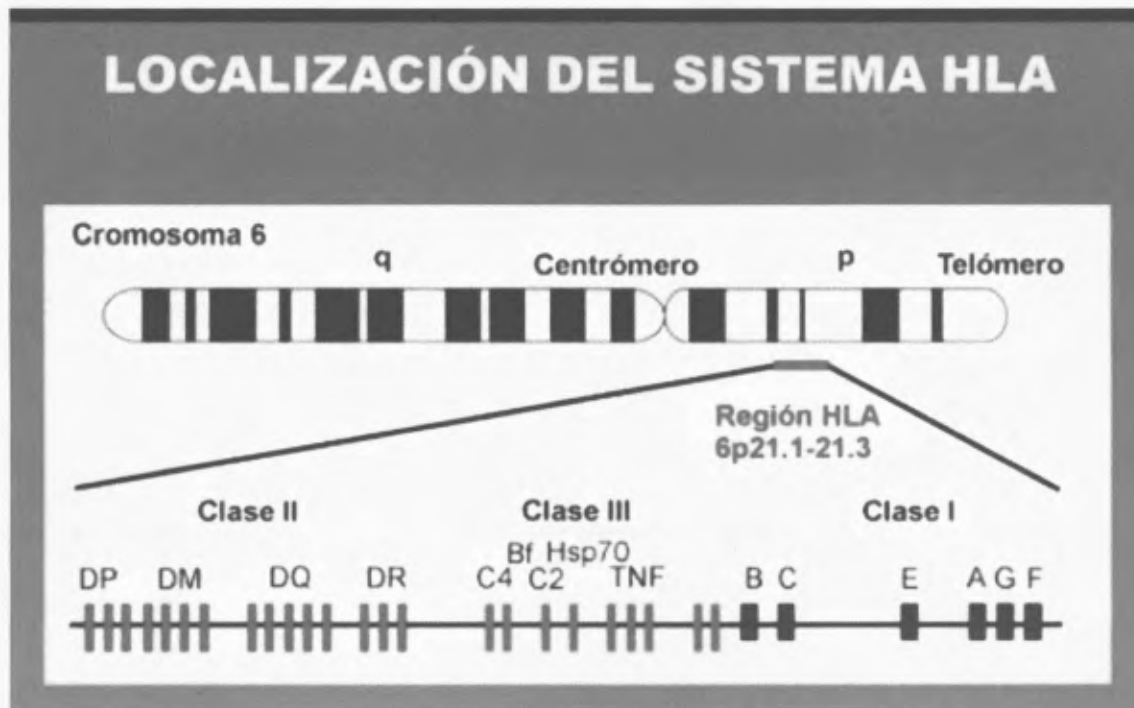


Fig. 1 Vista de Localización del sistema HLA en el brazo corto del cromosoma 6

Región HLA clase I

Región de clase I Es la región más telomérica y abarca un segmento cromosómico de unas 1600 Kb. Comprende seis subgrupos de genes cuya nomenclatura está relacionada con el orden cronológico de su descripción, estructura, funcionalidad y patrón de expresión celular.

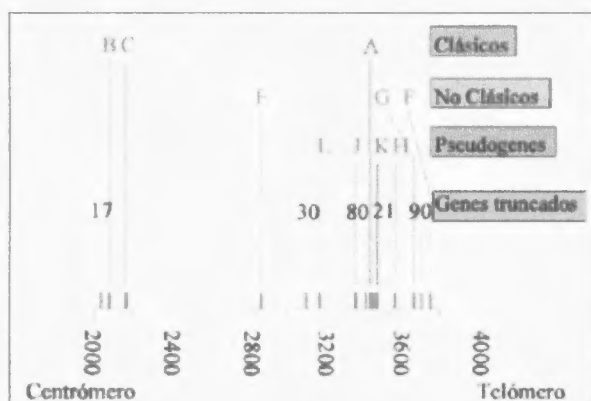


Fig. 2- Genes de la región HLA de clase I

En la Fig. 2 se esquematiza la localización de estos genes en la región de clase I. Genes HLA de clase I “clásicos” o Ia: A este grupo pertenecen los genes HLA-A, -B y -C. Son los primeros descritos dentro del sistema HLA (Gómez *et al.*, 2015). Codifican para glicoproteínas de membrana que se expresan en prácticamente todas las células del organismo, si bien su nivel de expresión varía desde un máximo en células pertenecientes al sistema inmune (linfocitos T, B y macrófagos) hasta un mínimo en células musculares, del sistema nervioso y fibroblastos. Son moléculas implicadas en la restricción del reconocimiento antigénico mediada por linfocitos T citotóxicos. Genes HLA de clase I “no clásicos” o Ib: Son HLA-E, -F y -G. Codifican para proteínas estructuralmente similares a las de los genes clásicos. Se diferencian básicamente de los anteriores por su limitada expresión tisular, su bajo polimorfismo y por su función aún poco conocida. Además, en la región de clase I se han descubierto toda una serie de secuencias de DNA que según su mayor o menor grado de similitud con genes funcionales se han clasificado en: Fig. 1 – Vista de la localización del sistema HLA en el brazo corto del cromosoma 6. 39 Pseudogenes Hasta la fecha se han descrito cuatro pseudogenes nombrados como HLA-H, -J, -K y -L 6. Se sitúan en las proximidades de HLA-A, teloméricos o centroméricos a éste.

Todos ellos tienen en comun la presencia de deleciones que rinden codones de terminacion prematuros. Se desconoce si tienen alguna funcion biologica.

Genes truncados Son los denominados HLA 16, 75, 80 y -90. Presentan homologia con los genes de clase I en zonas extensas. HLA 75 es el unico que tiene homologia con la region 5' UT (del ingles UnTranslated) de los genes de clase I, los demas la presentan con la region 3' UT.

Segmentos genicos Son las secuencias mas pequenas y con un menor grado de homologia con clase I, el cual se observa en cortas regiones exon/intron. Aqui se incluyen HLA 17, 21, 30 y 81. HLA 81 solamente presenta homologia con el exon 8 y region 3' UT, lo cual sugiere que podria ser un pseudogen procesado. Ademàs, mapea fuera del sistema HLA.

Genes no HLA que se encuentran dentro de la region de clase I. Existe un grupo de genes que mapean dentro de la denominada region de clase I pero que no tienen ninguna funcion conocida que los relacione con la presentacion antigenica, si bien muchos de ellos podrian ser genes reguladores. A este apartado pertenecen los genes OTF3, gen MOG, genes S, gen de la cadena beta de la tubulina, genes de la familia P5, genes HSR1, exon B30.2, gen de la prolactina, genes MIC y gen de la hemocromatosis. Dentro de este grupo quizas el mas interesante sea el gen de la hemocromatosis (HFE). La proteina para la que codifica parece estar implicada en el metabolismo del hierro. Se ha postulado, mediante un analisis de homologia de secuencia, que podria tener estructura de molecula de clase I (Gomez *et al* 2015).

Region HLA clase II

Region de clase II Es la mas centromerica y comprende unas 900 kilobases (Kb) Se divide a su vez en tres subregiones de centromero a telomero HLA DP DQ y DR Los genes de clase II se definen con la letra D seguida de la inicial de la subregion (P Q o R) Cada subregion se compone a su vez de varios genes Las proteinas para las que codifican estos genes estan implicadas en fenomenos de restriccion del reconocimiento antigenico mediado por linfocitos T cooperadores CD4+ Su distribucion tisular esta practicamente limitada a celulas del sistema inmune linfocitos B macrofagos linfocitos T activados etc Entre las subregiones DP y DQ aparecen otra serie de genes poco conocidos estos son DN DO DMA y DMB10 12 Adem as en esta misma zona tambien se han descrito los genes TAP (TAP1 y TAP2) que codifican para proteinas transportadoras de peptidos y LMP que intervienen en el procesamiento antigenico (Gomez *et al* 2015)

Region HLA clase III

Region de clase III Al menos 36 genes han sido identificados en el fragmento cromosomico que corresponde a esta region Estos genes fuertemente ligados abarcan un segmento de DNA de unas 100 Kb No todos sus genes presentan funcion inmunologica Asi esta region incluye factores del complemento de la via clasica (C4A C4B C2) y de la via alternativa (Bf) Tambien mapean en esta zona los genes A y B de factores de necrosis tumoral (TNF A y TNF B) genes para las proteinas inducidas por estres (HSP70 1 y HSP70-2) y muchos otros algunos de ellos de funcion desconocida La presencia en esta region de genes sin relacion funcional o evolutiva con los antigenos HLA hace que muchos

autores no la consideren como perteneciente al Sistema Principal de Histocompatibilidad (Gomez *et al* 2015)

Genes similares a clase I codificados fuera del sistema HLA

Se han descrito recientemente (Gomez *et al* 2015) una serie de genes con estructura similar en mayor o menor medida a los genes de clase I. Los más reseñables son CD1, FcRn, MR1 y beta 2 glicoproteína unidora de Zinc. Todos ellos se consideran genes relacionados evolutivamente con los genes HLA. CD1 y MR1 mapean en el cromosoma 1 al igual que muchos otros genes pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. La proteína codificada por el gen FcRn (receptor Fc neonatal) se encarga de unir IgG (inmunoglobulina G) procedente de la leche materna ingerida por el recién nacido y transportarla a través del intestino. Juega un papel importante en la adquisición pasiva de inmunidad humoral en el neonato. También se ha encontrado en la placenta humana donde se encargaría de transportar IgG. Se ha demostrado hace poco que CD1 es capaz de presentar lípidos y glucolípidos a los linfocitos T. Varios científicos han postulado que este grupo de genes podría representar una línea importante de defensa frente a diferentes agentes infecciosos uniéndose a ligandos no polimórficos de los microorganismos tales como péptidos, carbohidratos, derivados de nucleótidos, lípidos, etc. (Gomez *et al* 2015)

Estructura de los antígenos HLA de clase I

Estructura proteica de los antígenos HLA de clase I clásicos. Los antígenos HLA de clase I clásicos (HLA A, B y C) son glicoproteínas de membrana compuestas por dos cadenas polipeptídicas: una cadena pesada alfa de unos 44 Kílodalton (Kd) codificada en el sistema HLA y una cadena ligera beta de 12 K, la beta2 microglobulina cuyo gen se encuentra fuera

del sistema HLA, en el cromosoma 15. La cadena pesada es el único miembro del heterodímero que atraviesa la membrana celular y cuyo extremo aminoterminal está orientado hacia el exterior de la célula. Ambas cadenas se unen no covalentemente en su porción extracelular (ver Fig. 3). La cadena alfa está formada por 338 aminoácidos (HLA-B) o 341 aas (HLA-A y -C). (Golberg, 2015)

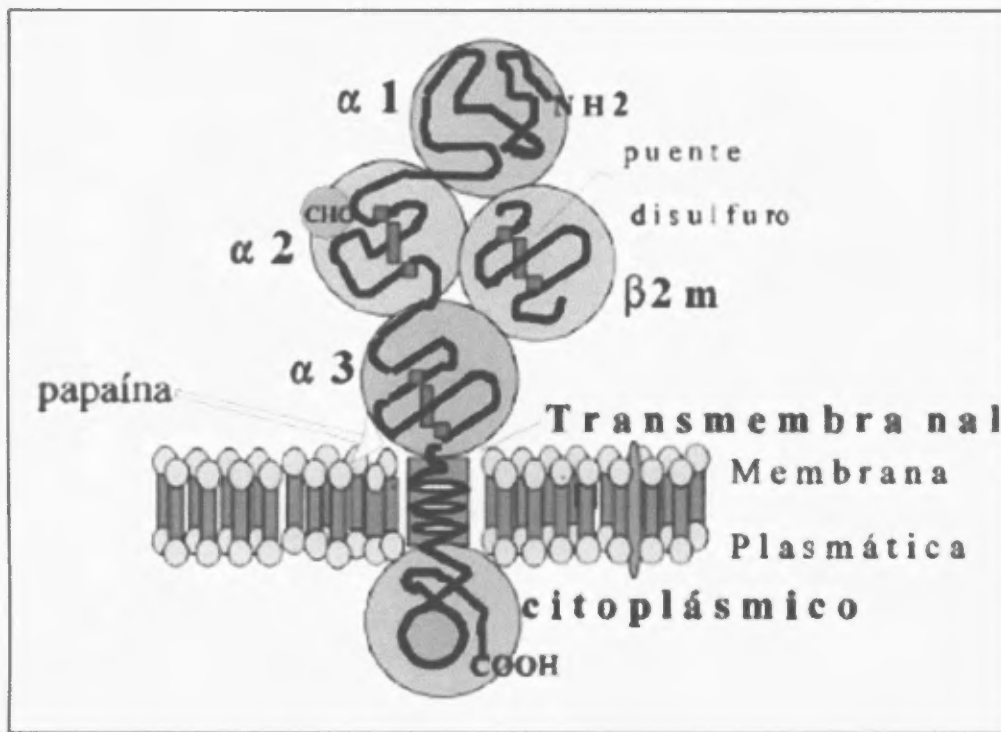


Fig. 3- Estructura esquemática de la molécula HLA de clase I. proteína transmembranal que presenta una región alfa compuesta de tres dominios globulares, y una región beta 2 microglobulina.

La porción extracelular de esta cadena se divide en tres dominios globulares bien diferenciados de unos 90 aas cada uno, que pueden escindirse de la superficie celular bajo la acción proteolítica de la enzima papaína, (aas 1-90, porción N-terminal de la cadena), dominio alfa2 (aas 91-182) y dominio alfa 3 (aas 183-247), codificados cada uno por un

exon 28 La porcion transmembrana con estructura de alfa helice de unos 25 aas se continua con un pequeño tallo citoplasmatico de 30 aas aproximadamente rico en tirosinas y serinas Los dominios alfa1 y alfa2 de las cadenas pesadas de las moleculas de clase I son altamente polimorficos a diferencia de alfa3 que esta mas conservado El dominio alfa3 y la cadena ligera beta2 m presentan alta homologia de secuencia y estructura con las regiones constantes de las inmunoglobulinas Las moleculas de clase I se consideran miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas por tener un origen evolutivo comun y por similitudes estructurales mas evidentes en el dominio alfa3 Esta superfamilia tambien incluye a las moleculas de clase II al TcR CD4 y CD8 En 1987 (Bjorkman et al 1987) Bjorkman y colaboradores definieron la primera estructura tridimensional de una proteina HLA concretamente el antigeno HLA A2 Posteriormente se ha conseguido cristalizar varios antigenos mas como HLA Aw68 HLA B27 HLA B35 y HLA B53 Todos los cristales obtenidos presentaban una region distal formada por los dominios alfa1 y alfa2 de la cadena pesada y una region proximal a la que pertenecen los dominios— Representacion tridimensional de la molecula de clase I HLA A*0201 a) dominios moleculares de union a antigeno b) estructura completa de HLA A*0201 con un peptido asociado y la beta2 m c) la misma estructura anterior interaccionando con el TcR contiene una helice corta adicional en posicion carboxi terminal que une los dominios alfa2 y alfa3 Las laminas alfas de ambos dominios forman la base de una valva flanqueada por las alfa helices orientadas hacia el exterior Esta valva formada por los dominios alfa1 y alfa2 de las moleculas de clase I constituye la estructura para la union de los peptidos procesados El gran polimorfismo que muestran estas moleculas se encuentra concentrado en esta valva Estos residuos polimorficos sirven para interaccionar con los distintos peptidos y/o con el TcR De los 20 residuos aminoacidicos de alta variabilidad identificados en las moleculas

de HLA constituyen residuos de posible contacto con el péptido (posiciones 9 24 45 66 67 70 74 77 80 95 97 114 116 y 156) uno contacta con el TcR (posición 65) y cuatro más contactan con el péptido y con el TcR (residuos 62 69 76 y 163) Se establecen toda una serie de contactos intra e interdominios entre $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Aparece un puente salino entre las posiciones 55 de $\alpha 1$ y 170 del dominio $\alpha 2$. Dos puentes disulfuro unen las cisteínas de las posiciones 101 y 164 de $\alpha 2$ y las posiciones 203 y 259 de $\alpha 3$ además de varias interacciones de puentes salinos interdominios. Todas estas relaciones entre aas contribuyen a la estabilidad de la molécula de clase I en su parte distal. La asparagina en la posición 86 aparece N glicosilada si bien esta ramificación no es esencial para el ensamblaje de la molécula ni para su expresión en superficie. La región proximal a la membrana está formada por el dominio $\alpha 3$ y la $\beta 2m$ y cada uno de ellos al igual que los dominios constantes de la inmunoglobulina consisten en dos láminas antiparalelas una formada por 4 hebras y la otra por tres. Las hebras de cada lámina se conectan entre sí por puentes disulfuro internos formando una estructura similar a un sandwich. La $\beta 2m$ se sitúa por la parte de abajo de la valva formada por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de tal manera que existe un mínimo contacto entre estos dos dominios y el $\alpha 3$. Si los dominios $\alpha 1/\alpha 2$ interactúan con el péptido y con el TcR reconociendo residuos polimórficos el dominio $\alpha 3$ lo hace con el correceptor de la célula T (CD8) reconociendo determinantes monomórficos en $\alpha 3$.

La interacción con CD8 requiere la presencia de aas ácidos en las moléculas de clase I en posiciones 223 227 y 229 que ocupan una zona localizada en un lazo del dominio $\alpha 3$ en una cavidad justo debajo de la valva. Recientemente se ha demostrado que el dominio $\alpha 3$ no es imprescindible para el mantenimiento de la conformación nativa de la valva al menos

en lo que se refiere a su union al peptido a presentar La variabilidad que presentan las moleculas de clase I se traduce en cambios topologicos en los sitios de union a peptido Las características químicas y la exclusiva configuración de la estructura de cada valva (o Peptide Binding Groove) explica como pueden unir gran variedad de peptidos Se identificaron una serie de depresiones a lo largo de la valva son las llamadas Peptide binding Pockets o bolsillos Los peptidos unidos a la valva pueden acomodar una o mas de sus cadenas laterales aminoácidas en estos bolsillos Se han identificado seis bolsillos denominados con letras de la A a la F localizados en las uniones de las laminas beta con las alfa helices (bolsillo B C D y E) o en los extremos de las dos alfa helices (bolsillos A y F) (ver Fig 4) Estos dos ultimos contienen aas mas conservados que los otros cuatro De las 18 posiciones de alta variabilidad identificadas en las proteínas de clase I que interaccionan con el peptido y/o con el TcR 16 estan situadas en la valva Fig 4

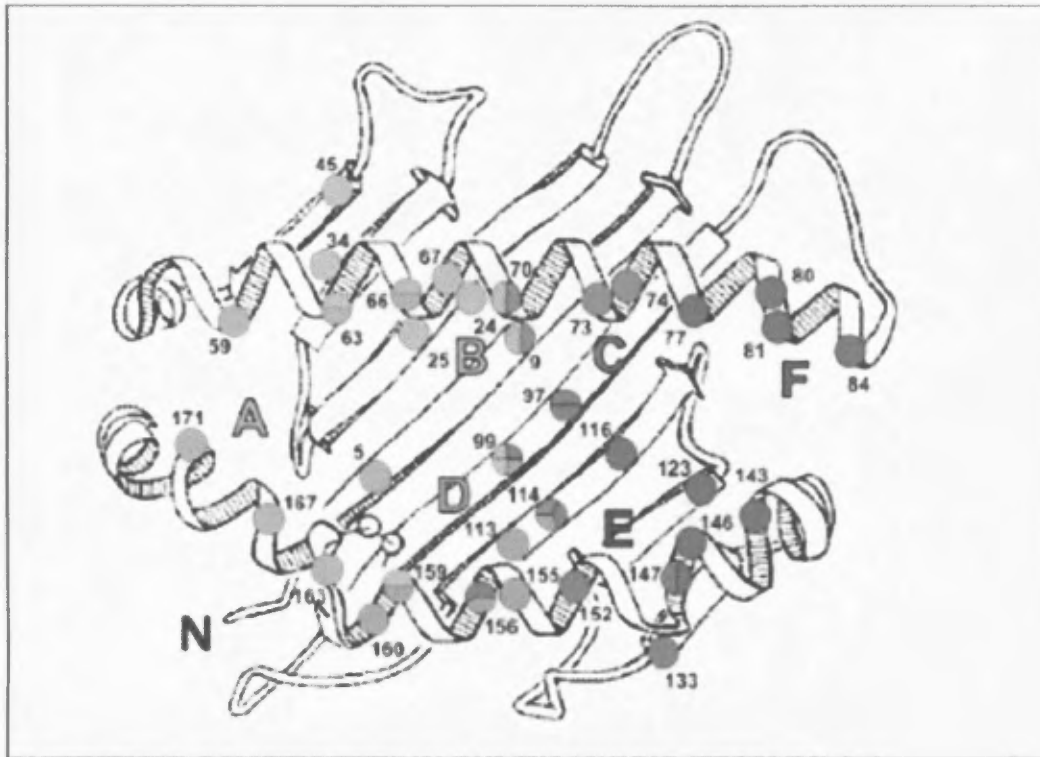


Fig. 4 Disposición de los bolsillos de unión al péptido en la molécula HLA de clase I. El color de cada círculo representa la contribución a cada bolsillo.

Estructura de los antígenos HLA de clase I no clásicos Se han caracterizado tres genes considerados como no clásicos (Ib) llamados HLA-E 44, 45, HLA-F 46 y HLA-G 47 (ver Fig.2). En líneas generales se puede decir que no existen grandes diferencias en cuanto a la organización exón/intrón de estos genes con respecto a los clásicos, aunque poseen una serie de características peculiares que los diferencian de los genes Ia; estas son: • Restringida distribución tisular (-G y -F). Bajo polimorfismo. (Gómez *et.al.*2015)

Estructura de los antígenos HLA de clase II

Las moléculas MHC de clase II son glucoproteínas unidas a membrana, con dominios extracelulares, segmento transmembrana y cola citoplásmica. En la siguiente tabla se muestran las formas isotípicas en ratón y en humanos, junto con sus equivalencias: Cada

molecula de clase II esta formada por dos cadenas una a y otra b que se asocian entre si de forma no covalente (Golberg 2015)

La cadena a tiene unos 33 kDa y consta de dos dominios globulares (el amino terminal a₁ sin puentes disulfuro y el a₂ de tipo Ig con su puente disulfuro) un segmento transmembrana y finalmente una cola intracitoplasmica

La cadena b de unos 28 kDa consta de un dominio aminoterminal (b₁) con puentes disulfuro (pero no de tipo Ig) seguido por el dominio b₂ de tipo Ig (con puentes disulfuro) segmento transmembrana y cola intracitoplasmica

Los dominios distales respecto de la superficie celular (a₁ y b₁) interaccionan entre si de modo no covalente formando la estructura que se une a peptidos derivados de procesamiento intracelular por via endocitica de antigenos exogenos Entre los dos forman una estructura tridimensional bastante parecida a la de los dos dominios distales de la cadena a del MHC I ocho plegamientos b antiparalelos que forman el "suelo" de la hendidura dos cadenas alfa helicoidales que forman los brazos o paredes laterales de dicha hendidura

Los peptidos que se albergan en el surco de MHC II son mas largos que los de la clase I de 13 a 20 aminoacidos Esto parece que se debe al hecho de que la hendidura de MHC II no esta tan cerrada por sus extremos Los peptidos no tienen por que encajar entre los limites de esta hendidura sino que pueden sobresalir de ellos (aspecto de un perrito caliente)

Figura #5

Al igual que en MHC-I, las moléculas de clase II pueden unirse a un número amplio pero finito de péptidos, de modo que cada variante alélica tiene una gama de péptidos a los que se engarza.

Cuando se cristalizó el MHC-II humano, se vio que aparecía como dímeros del heterodímero ya citado, es decir, $(\alpha\beta)_2$. Los dímeros están situados de modo que las hendiduras respectivas están enfrentadas. (López *et al.*, 2005).

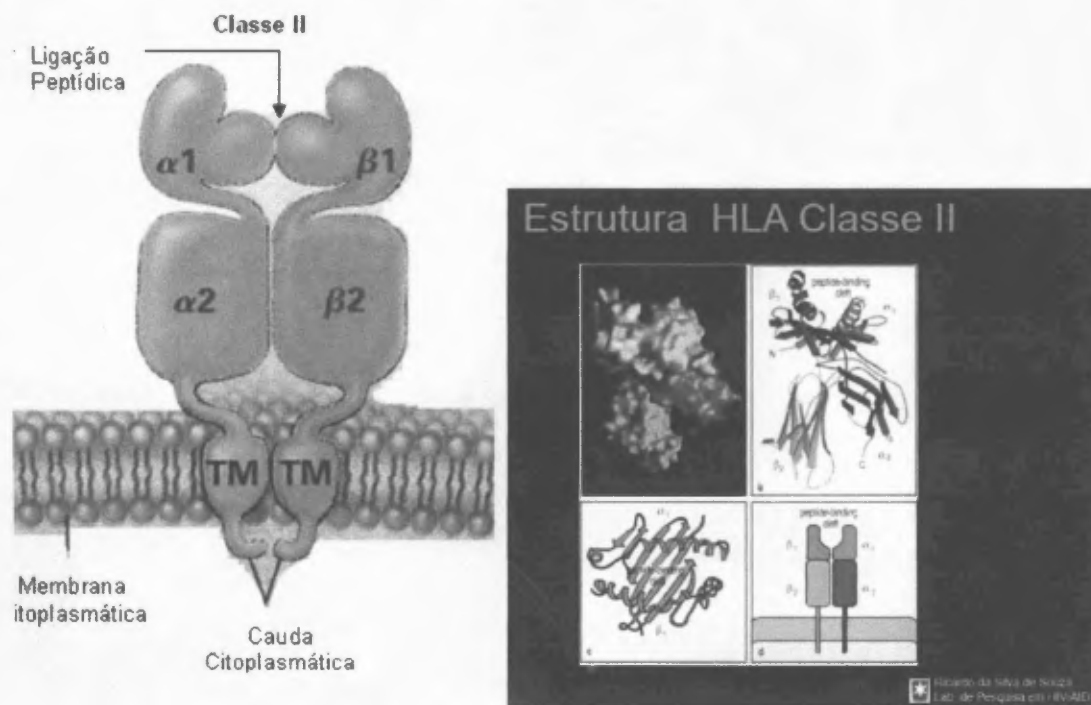
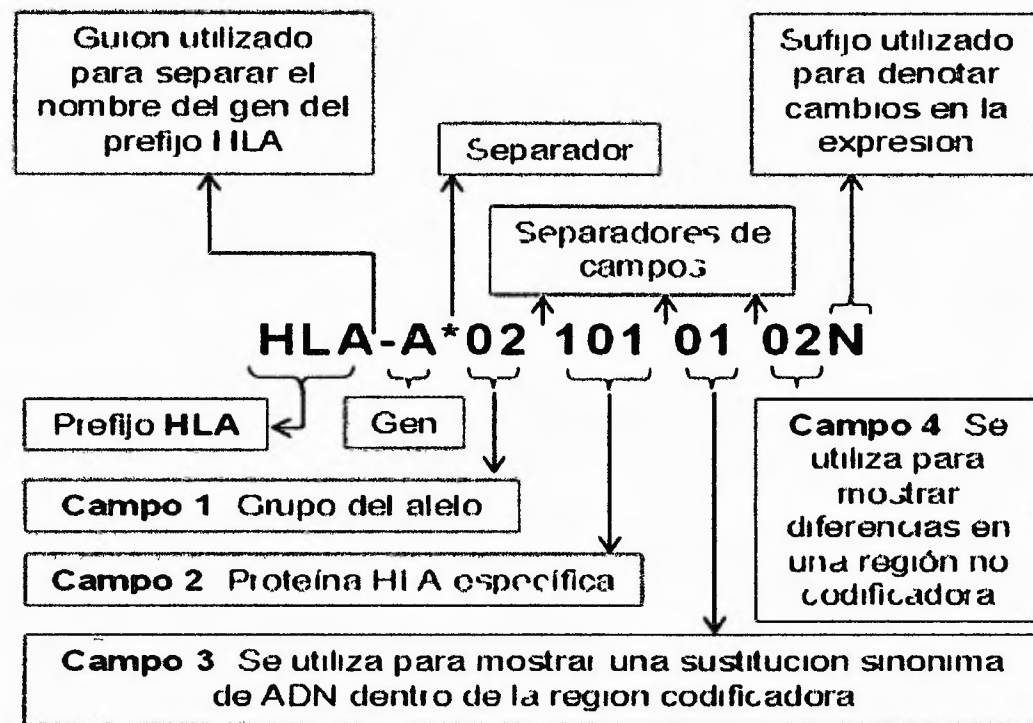


Figura esquemática de Estructura de los antígenos HLA de clase II formado por dos heterodímeros uno alfa y otro beta.

Figura #5

Nomenclatura HLA

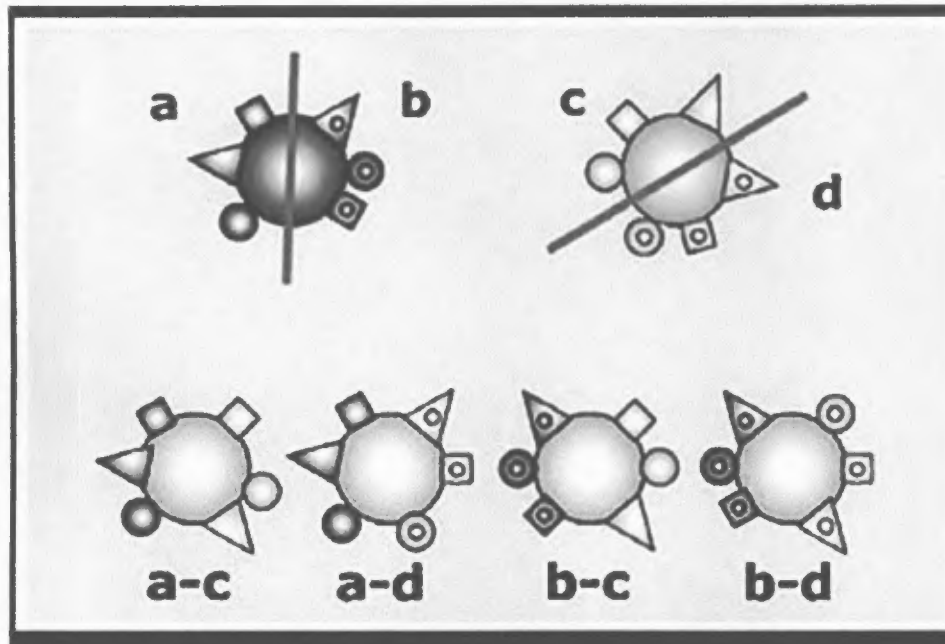


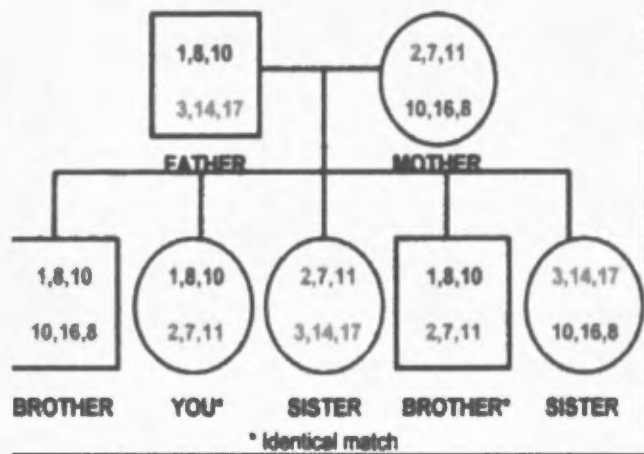
(Tomado y modificado de *Nat h SG Tissue Antigens* 2010 Apr 75(4) 292-355 #8)

Fig Nomenclatura actual del sistema HLA

Asignación de Haplotipos HLA

Los haplotipos HLA se heredan en grupos de alelos, en las siguientes figuras se denotan diferentes formas de mostrar como se heredan dichos haplotipos.





Variabilidad inmunogenética en una población.

La heterogeneidad del acervo genético poblacional es un asunto bastante complejo. No sólo se debe tomar en cuenta la contribución de al menos tres fuentes principales de alelos (América, Europa y África), sino también el factor único del mestizaje, que, además de modificar las frecuencias alélicas de generación en generación, puede generar nuevos haplotipos y modificar las asociaciones entre alelos de HLA. (Barquera, 2012). Dentro de este peculiar acervo genético, se han encontrado representantes de prácticamente todos los grupos de alelos principales de este sistema. Se debe entender que entre los alelos presentes en nuestra población, hay algunos que son específicos de determinados grupos humanos (nativos americanos, africanos, norafricanos, europeos, asiáticos de Oriente Medio y Lejano Oriente o habitantes nativos de Australia e islas del Océano Pacífico) y otros que son prácticamente ubicuos, es decir, que han conservado su presencia en muchas de las poblaciones humanas desde su dispersión a partir de los primeros grupos que salieron de África hace unos 50,000 o 60,000 años⁴⁷, descendientes de poblaciones de *Homo sapiens* anatómicamente modernos que vivieron en África hace cerca de 100,000-150,000 años; dentro del sistema HLA⁴⁹, destacan los alelos HLAA*02, -A*24, -A*68 y -B*35 como

ejemplo de variantes que han viajado con la humanidad desde que dejó su cuna geográfica en el Este de África. Otros se encuentran presentes en los grupos humanos nativos que habitaban grandes extensiones geográficas desde antes de las expansiones coloniales de los siglos XVI a XIX. El alelo HLA DRB1*04 se encuentra en grupos europeos, asiáticos y nativos americanos. El alelo B*39 en asiáticos y nativos americanos. Alelos del grupo B*14 distribuidos por el llamado Viejo Mundo y las variantes del alelo DRB1*03 en grupos africanos subsaharianos o norafricanos, europeos y de Medio Oriente. También hay algunos alelos restringidos a determinadas poblaciones o grupos humanos, como el HLA B*47 encontrado en grupos judíos, el alelo B*46 de los grupos del Este Asiático (japoneses, chinos, etc.) o el subtipo DRB1*14:02 encontrado en grupos nativos de América, en particular en América del Norte. Además, no debemos olvidar que el sistema continuamente arroja nuevos alelos, ya sea por mutaciones puntuales, recombinación o conversión génica, lo que hace más complicado el panorama genético poblacional. Al trabajar con HLA es indispensable recordar estas características del sistema genético (Barquera 2012).

Ahora bien, no es un mapa de presencia/ausencia lo que se revela al colocar la distribución de los alelos geográficamente. También la frecuencia de los alelos juega un papel importante en la interpretación de los datos. Si bien el mestizaje es un evento de gran magnitud característico de nuestra población, no es privativo de los grupos humanos latinoamericanos y otros afectados por la política colonial de la Europa de los siglos XVI a XIX, pues siempre ha habido una cierta cantidad de contacto entre poblaciones, y esta es de manera general inversamente proporcional a la distancia que las separa. La simple presencia de un alelo en una región geográfica no nos dice mucho sobre su origen y

dispersion sin embargo la frecuencia de un alelo nos puede decir un poco mas sobre la trayectoria que ha seguido e incluso algunas cuestiones sobre seleccion de esa variante en particular si esta en una region codificante Asi el hecho de encontrar alelos en todo el mundo pero con mayor frecuencia en ciertas regiones nos remonta a un posible grupo humano que portaba la variante original y como se dispersa alrededor de su sitio de origen Pero trazar la historia que cuenta la genetica a partir de alelos y frecuencias es arriesgado Las asociaciones entre alelos características del sistema HLA son una manera mas precisa de estimar el grado de mestizaje en una poblacion y dibujar los movimientos poblacionales a traves de la geografía del planeta (Barquera 2012) (Fig 6)



Figura # 6 Presencia de algunas asociaciones y haplotipos característicos del sistema HLA en distintas poblaciones humanas. Los colores indican la ubicación de las poblaciones nativas en las que se han reportado estos haplotipos (Barquera, 2012)

Grupos étnicos de Panamá

Es conocido que la América fue poblada por o las de migración que comenzaron hace 20.000 o 40.000 años y que la población amerindia se estableció definitivamente en Suramérica hace 10.000 o 12.000 años. Varias hipótesis han sido desarrolladas para explicar el origen de la población indígena en Suramérica. La ruta de entrada terrestre sugiere una migración a través de la jungla de Darién, entre Panamá y Colombia. Una segunda posibilidad es la ruta marítima desde Florida hasta Suramérica, a través de las islas del Caribe. Una tercera posibilidad es la existencia de una ruta a través del Pacífico, que

llega hasta la costa peruana. Adicionalmente una segunda ola de migraciones hacia Suramérica ha sido postulada. Esta incluye la clásica ruta a lo largo de las costas del Pacífico y los Andes y o las de migración originadas en el este del Amazonas y directamente a través de Venezuela, Colombia y Guyana (Echeverría *et al* 2008).

Se ha propuesto que los primeros amerindios proceden de y 10 000 años antes del presente (AP). Estas conclusiones se basan en similitudes culturales, morfológicas y genéticas entre las poblaciones de América y Asia. Tanto Siberia como Mongolia en Asia se han sugerido como los lugares más probables del origen asiático. Greenberg fue el primero en postular la teoría de la triple migración para explicar el poblamiento de América: amerindios (12 000 años AP), na-dene-atabascos, navajo y apaches (8 000 años AP) y eskimo-aleutianos (6 000 años AP). Otros autores sugieren que hubo una única oleada migratoria de los ancestros de los primeros nativos americanos y habría tenido lugar desde Mongolia/Norte de China (Rey *et al* 2012). Panamá es uno de los países étnicamente más diversos del mundo. Su población está compuesta por mestizos, mulatos, negros, blancos, indígenas y de diversos orígenes nacionales: chinos, hindúes, judíos, españoles, estadounidenses, colombianos, italianos, argentinos, griegos, franceses, árabes, costarricenses, venezolanos, antillanos, dominicanos, chilenos, entre otros. Con más de 3.3 millones de habitantes, su población está compuesta en un 67% de mestizos (amerindios con blancos) y mulatos (blancos con negros), 14% negros, 10% blancos, un 6% de amerindios (indígenas) y un 3% de personas de orígenes étnicos variados. Siendo un país que respeta el libre credo, la población de nuestro país está compuesta por una mayoría Católica Romana de un 85%, por lo que fechas como la Navidad y los Carnavales, colorida y agitada festividad de cuatro días precedente a la Cuaresma, son ampliamente celebradas.

en Panama. Le siguen los cristianos evangelicos con un 10%. El 5% restante se divide entre el judaismo, el budismo, el hinduismo, la Ortodoxia y grupos derivados del cristianismo protestante como Testigos de Jehova y Adventistas del Septimo Dia.

Los siete grupos indigenas de Panama se encuentran asentados en territorios semiautonomos. Los mas representativos de la region occidental como las provincias de Chiriqui, Bocas del Toro y Veraguas son los Ngobe y los Bugle, Naso, Teribe y los Bri bri. Juntos comprenden un 70% de la poblacion indigena del pais. En la region oriental de Panama esta poblada por los Embera y los Wounaan en el Darien y los Kuna en la comarca de Kuna Yala. Los Embera y los Wounaan viven en la selva tropical tal como sus ancestros lo hicieron durante siglos. Su comprension y respeto por la naturaleza es innato y sus habilidades en el tallado y tejido de canastas es exquisito. Los Kuna se asentaron en las costas e islas del Caribe y se caracterizan por una ferrea proteccion de sus tradiciones y por sus molas, las cuales son artesanias hechas con aplicados sobre tela.

Los descendientes de africanos se establecieron en la region central de Panama y en el Darien donde la cadencia del Bullerengue y el Bunde todavia evocan los origenes de sus tradiciones. Originalmente fueron traídos al istmo por los colonos españoles para trabajar en las plantaciones de caña de azucar. Una segunda ola de inmigracion negra llego al istmo desde las Antillas para la construccion del Canal de Panama a inicios del siglo 20. Este grupo de habla inglesa se establecio en la Ciudad de Panama, Colon y Bocas del Toro. Los mestizos y mulatos son el resultado de años de uniones entre diversas razas y etnias dispersos en todo Panama. Su folklore se expresa por medio de la musica y danza, comidas regionales como el arroz con pollo y sancocho de gallina, su actitud festiva, la que reluce en ferias y festivales, así como su caracteristico trato amigable hacia los extranjeros.

La posición geográfica privilegiada de nuestro país lo ha convertido en un punto de encuentro entre diversas etnias y razas hoy en día accesible para todo viajero haciéndolos sentir en casa recordando siempre sus tradiciones y su constante deseo de evolucionar como cultura

El éxito de un trasplante es determinado por múltiples factores de los cuales la compatibilidad del sistema de Antígeno Leucocitario Humano (HLA) entre donante y receptor es uno de los más importantes. La supervivencia del Trasplante de riñón se caracteriza en ser mayor mientras más compatibilidad exista con el órgano trasplantado

El grado de compatibilidad está determinado por la cantidad de genes HLA similares en ambos individuos. De allí que determinar la presencia de dichos genes es crucial en los programas de trasplante

En Panamá se consta con varias modalidades de trasplante. La primera Trasplante Renal con donante vivo relacionado en el cual un donador vivo emparentado cede uno de sus riñones a un familiar. La compatibilidad en este programa se determina en los locus HLA A HLA B y HLA DRB1

El programa de Trasplante renal con donante Fallecido en donde un Donante altruista cede sus órganos al estado después de diagnosticado su fallecimiento los cuales serán implantados en un receptor ubicado en una lista de espera nacional se le coloca un riñón a cada receptor compatible los locus utilizados para determinar la compatibilidad HLA son los HLA A HLA B HLA DRB1

El programa de injerto de Células pluripotenciales Hematopoyéticas en el cual se estudian de hermanos de doble vínculo (de padre y de madre) los cuales deben ser idénticos en el

sistema HLA para los locus HLA A HLA B HLA C HLA DQB HLA DPB HLA DRB1

En Panama la frecuencia de genes del sistema HLA solo ha sido determinada con tecnicas que detectan antigenos de superficie lo que no representa la totalidad del polimorfismo y unicamente describe formas mayores correspondientes a los genes que en ese momento se utilizaban para determinar la compatibilidad en trasplante de organos (Vernaza *et al* 1997) Las tecnicas de biologia molecular proporcionan una mejor resolucio n de los genes HLA que son reconocidas por la Organizacio n Mundial de la Salud por tal motivo la necesidad de tener datos a nivel molecular para fines terapeuticos de trasplante de organos motivo a implementar dichas tecnicas en el Laboratorio Nacional de trasplante Dicho Laboratorio es el encargado de realizar estos estudios para la poblacio n panameña que requiera el servicio

Tecnologia Luminex (Tepnel Lifecodes)

La tipificacio n de los genes HLA mediante el kit de amplificacio n de tepnel Lifocodes SSO utiliza oligonucleotidos de secuencias especificas (SSO) para identificar cual de los alelos HLA esta presente en nuestras muestras amplificadas de la Reaccio n de la cadena de la DNA polimerasa (PCR) En esta amplificacio n uno de los cebadores se encuentra en relativo exceso con respecto al otro cebador por lo cual la reaccio n genera unos productos de DNA de una sola hebra ademas de los productos de doble hebra Durante los ciclos iniciales de la reaccio n utilizando Lifecodes productos de ADN de doble hebra seran generados Una vez que el cebador que esta limitado se agota el cebador restante utiliza el producto de doble hebra como molde para general ADN de una sola hebra Este metodo genera ambos productos de doble hebra y de una sola hebra Durante la desnaturalizacio n

ambas hebras podran participar en la reaccion de hibridacion Las sondas son diseñadas para que cada una de ellas hibride de forma diferencial a una region complementaria que puede o no estar presente en el ADN amplificado El analisis de los resultados generados por la tipificacion SSO ser utilizado para determinar la presencia o ausencia de una secuencia de particular de ADN en el amplificado y poder identificar el posible loci en cada muestra En este procedimiento las sondas estan unidas a microesferas diseñadas para utilizar el instrumento Luminex Cerca de cien poblaciones diferentes de micro esferas Luminex pueden estar mezcladas y analizadas con el equipo luminex debido a que cada poblacion de microesfera puede ser distinguida por su unica fluorescencia infrarroja o color El equipo Luminex es capaz de cuantificar la cantidad relativa de producto de PCR marcado en la hibridacion para cada microesfera Por lo tanto la señal relativa obtenida de la sonda SSO en el ensayo puede ser utilizado para asignar la sonda como positiva o negativa en la muestra de ADN amplificado

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- 1 Determinar la frecuencia de Genes y Haplotipos del sistema HLA por las técnicas PCR-SSP Y PCR SSO en la poblacion atendida en el Laboratorio Nacional de Trasplante en Panama desde abril del 2007 hasta noviembre de2013

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1 Identificar genes y haplotipos del sistema HLA a traves de la utilizacion de PCR SSP y PCR SSO
- 2 Comparar las frecuencias de los genes HLA y sus haplotipos identificados con relacion a las encontradas en otras poblaciones
- 3 Resaltar la importancia de la compatibilidad del sistema HLA entre donante y receptor para el programa de trasplante de organos

METODOLOGÍA

METODOLOGIA

TIPO DE ESTUDIO Retrospectivo Descriptivo

UNIVERSO Muestras de ADN de individuos de los diferentes programas de Trasplante de organos establecidos en la Republica de Panama (Trasplante Renal con modalidad donante vivo Relacionado Trasplante renal modalidad donante Fallecido Injerto de Celulas Pluripotenciales Hematopoyeticas) entre el periodo comprendido abril del 2007 hasta el mes de noviembre del 2013

POBLACION Un total de 396 muestras de donantes y receptores de injerto para trasplante fueron analizados estas muestras comprenden el total del Universo

CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

Fueron incluidas las tipificaciones HLA de los grupos estudiados en el periodo de (abril del 2007 noviembre del 2013) En la recoleccion de los datos de los Haplotipos HLA se contaba solo una vez cada haplotipo identificado en el grupo familiar lo que nos daba un maximo de cuatro haplotipos por grupo familiar dos de origen paterno y dos de origen materno independiente de cuantos integraban dicho grupo asi evitamos sobreestimar los haplotipos encontrados

MÉTODOS

EXTRACCION DE ACIDOS NUCLEICOS

Se recolectaron en forma aseptica muestras de sangre periferica anticoaguladas con EDTA de los individuos seleccionados. La extraccion del ADN se realizo utilizando el procedimiento de purificacion de ADN genómico (PROMEGA www.promega.es) o alternativamente el procedimiento Mini Kits de ADN para la purificacion de ADN genómico a partir de tejido sangre y fluidos corporales (QIAGEN www.qiagen.com). En ambos casos el procedimiento desarrollado fue el descrito por el fabricante.

MEDICION DE LA CONCENTRACION DE ADN

La concentracion de ADN fue determinada mediante fluorometria utilizando el fluorometro Qubit (Thermo Fisher USA massachusetts). La fluorometria utiliza tintes cuya intensidad es directamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra. La concentracion de las muestras fue ajustada a 25 µg/ml.

IDENTIFICACION DE LOS GENES HLA

Identificacion con PCR-SSP

La identificacion de los genes HLA se realizo mediante la utilizacion de reaccion en cadena de la polimerasa con cebadores de secuencias especificas (PCR SSP) o reaccion en cadena de la polimerasa utilizando sondas especificas de oligonucleotidos (PCR SSO).

En la identificacion con PCR SSP se utilizo EL Kit Olerup Combi Tray (Olerup Stockholm Sweden).

El procedimiento consiste en adicionar 10 µl de una muestra de ADN Taq polimerasa y dNTPs a cada uno de los pocillos de la bandeja que proporciona la casa comercial la cual contiene los cebadores específicos para los diferentes alelos. La cantidad de pocillos utilizados por paciente dependerá de los genes que se requiera identificar para el tipo específico de trasplante. Una vez adicionada la mezcla en cada pocillo la bandeja se colocará en el termociclador Perkin –Elmer (Gene Amp 9600). Las condiciones de amplificación para la detección de los genes HLA fueron 94°C por 2 min luego diez (10) ciclos que incluyen 94°C por 10 segundos 65°C por 60 segundos y luego el protocolo continuo con 20 ciclos que incluyen 94°C por 10 segundos de 65 °C por 50 segundos 72°C por 30 segundos. Los productos de amplificación serán evidenciados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% con de Etidio (10 mg/ml). La asignación de los alelos presentes en cada muestra fue determinada con base a la presencia del producto de amplificación específico para cada alelo y la ayuda de la matriz del sistema (Olerup SSP tipificación genómica del HLA). Además en la reacción se utiliza como control positivo de amplificación un cebador que amplifica el gen de la hormona de crecimiento humano el cual es un gen constitutivo.

Controles de Calidad

Control Negativo para cada corrida antes de la etapa de amplificación de la PCR se incluyó un control negativo el cual contiene la mezcla maestra con los cebadores y la enzima polimerasa, pero presenta ADN de los pacientes en vez de eso se le agrega H₂O de grado molecular. En la etapa de hibridación este control no genera lectura.

Control positivo Dentro de las micropartículas del sistema Tepnelifecodes se encuentran dos sondas denominadas 200 y 300 las cuales hibridizan la hormona de crecimiento humano evidenciando presencia de ADN en la muestra

Identificación con PCR-SSO (Tepnel Lifecodes Stanford USA)

La identificación de los genes HLA mediante PCR SSO se realizó con el Kit PCR SSO kit (Tepnel Lifecodes) El procedimiento consiste en combinar 5 µl de ADN en cada pocillo una mezcla de cebadores para el exon 2 de cada locus dNTPs Taq polimerasa (LIFECODES) Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo 95°C 5 min 8 ciclos que incluyen 95°C 30 seg 60°C 45 seg 72 °C 45 seg 32 ciclos que incluyen 95°C 30 seg 63°C 45 seg 72°C 45 seg 1 ciclo 72°C 15min Termociclador Applied Biosystem (2720) Finalizada la amplificación los amplicones resultantes se combinaron con sondas de secuencias específicas las cuales están adheridas a microesferas Las condiciones de hibridación fueron 97°C 2 min 47°C 10 min y 56°C por 8 minutos Cada microesfera posee un color infrarrojo identificado por los sensores del analizador de micropartículas LUMINEX (Equipo automatizado que posee un sistema integrado de Laser fluorescente adaptado a un foto detector de partículas) enviando la información al Software proporcionado por la casa comercial Tepnel Lifecodes el programa es (MATCH IT! DNA) el cual a su vez realiza la asignación de los alelos HLA presentes en cada individuo

Frecuencia de alelos HLA

La frecuencia de alelos HLA en la población fue determinada por conteo directo (individuos positivos para la presencia del alelo HLA/el número de individuos estudiados de nuestra población x 100)

Los haplotipos mas frecuentes fueron calculados cuantificando la presencia de cada haplotipo encontrado en los grupos familiares dividido entre el total de haplotipos identificados en nuestra poblacion

RESULTADOS

RESULTADOS

De los alelos HLA reconocidos por la Organización Mundial de la Salud logramos detectar el 90.4% para el locus A*, 80.0% del locus B*, 93.3% del locus C*, 100% del Locus DRB1*, 85.7% del Locus DQB* y 94.7% del Locus DPB*. Estos resultados se muestran en el cuadro N°1

Adicionalmente se determinaron las frecuencias de los alelos en nuestra población resultados que se muestran en los cuadros N° 2 y 7

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS HLA

En este estudio se detectaron un total de 379 haplotipos HLA. Los datos demostraron que los haplotipos más frecuentes en la población son

A24 B40-DR04 6.1%(n=23) A24 B35 DR04 5.0%(n=19) A02 B35 DR04 4.2%(n=16)
A24 B35 DR14 4.2%(n=16) A24 B35 DR16 1.8%(n=7) A02 B40-DR16 1.6% (n=6) y
A29 B44 DR07 1.6% (n=6) Cuadro N° 8

Cuadro N°1 Cantidad de alelos HLA detectados en nuestra población.

LOCUS	Alelos reconocidos por la OMS.	Números de alelos detectados	Porcentaje
HLA-A*	21	19	90.4%
HLA-B*	35	28	80.0%
HLA-C*	15	14	93.3%
HLA-DRB1*	13	13	100%
HLA-DQB*	7	6	85.7%
HLA-DPB*	19	18	94.7%
TOTAL	110	98	89.9% (Promedio)

Cuadro N°2 frecuencias de Alelos HLA-A*

ALELOS HLA-A*	n	frecuencia
A*01	42	5.3
A*02	190	23.8
A*03	42	5.3
A*11	34	4.3
A*23	35	4.4
A*24	186	23.3
A*25	7	0.9
A*26	12	1.5
A*29	28	3.5
A*30	57	7.1
A*31	37	4.6
A*32	13	1.6
A*33	17	2.1
A*34	9	1.1
A*36	2	0.3
A*43		0.0
A*66	5	0.6
A*68	66	8.3
A*69	1	0.1
A*74	16	2.0
A*80		0.0
TOTAL	799	100

Cuadro N°3 frecuencias de Alelos HLA-B*

ALELOS HLA- B*	n	frecuencia
B*07	42	5.3
B*08	21	2.7
B*13	6	0.8
B*14	19	2.4
B*15	74	9.4
B*18	16	2.0
B*27	16	2.0
B*35	167	21.2
B*37	3	0.4
B*38	10	1.3
B*39	44	5.6
B*40	128	16.3
B*41	7	0.9
B*42	15	1.9
B*44	46	5.8
B*45	7	0.9
B*46	2	0.3
B*47		0.0
B*48	7	0.9
B*49	20	2.5
B*50	10	1.3
B*51	39	5.0
B*52	11	1.4
B*53	20	2.5
B*54		0.0
B*55	2	0.3
B*56		0.0
B*57	22	2.8
B*58	31	3.9
B*59		0.0
B*67		0.0
B*73		0.0
B*78		0.0
B*81	1	0.1
B*82	1	0.1
TOTAL	787	100.0

Cuadro N°4 frecuencias de Alelos HLA-C*

ALELOS HLA-C*	n	frecuencia
C*01	75	9.6
C*02	35	4.5
C*03	178	22.9
C*04	154	19.8
C*05	24	3.1
C*06	42	5.4
C*07	146	18.8
C*08	36	4.6
C*12	15	1.9
C*13		0.0
C*14	8	1.0
C*15	19	2.4
C*16	22	2.8
C*17	22	2.8
C*18	2	0.3
TOTAL	778	100.0

Cuadro N°5 frecuencia de Alelos HLA DRB1*

ALELOS HLA-DRB1*	n	frecuencia
DRB1*01	36	7.0
DRB1*03	29	5.7
DRB1*04	121	23.6
DRB1*07	41	8.0
DRB1*08	39	7.6
DRB1*09	11	2.1
DRB1*10	10	1.9
DRB1*11	31	6.0
DRB1*12	5	1.0
DRB1*13	61	11.9
DRB1*14	46	9.0
DRB1*15	46	9.0
DRB1*16	37	7.2
TOTAL	513	100.0

Cuadro N°6 frecuencias de Alelos HLA-DQB*

ALELOS HLA-DQB*	n	frecuencia
DQB*01	6	1.8
DQB*02	41	12.0
DQB*03	172	50.4
DQB*04	38	11.1
DQB*05	40	11.7
DQB*06	44	12.9
DQB*09		0.0
TOTAL	341	100.0

Cuadro N°7 frecuencias de Alelos HLA-DPB*

ALELOS HLA-DPB*	n	frecuencia
DPB*01	25	8.3
DPB*02	25	8.3
DPB*03	26	8.7
DPB*04	128	42.7
DPB*05	4	1.3
DPB*06	7	2.3
DPB*10	1	0.3
DPB*11	3	1.0
DPB*12		0.0
DPB*13	7	2.3
DPB*14	52	17.3
DPB*17	9	3.0
DPB*18	4	1.3
DPB*26	2	0.7
DPB*40	1	0.3
DPB*23	1	0.3
DPB*27	2	0.7
DPB*85	1	0.3
DPB*09	2	0.7
TOTAL	300	100

CUADRO N°8 Haplotipos más frecuentes en nuestra población.

HAPLOTIPO	n	frecuencia
A24, B40, DR04	24	6.3
A24, B35, DR04	19	5.0
A02, B35, DR04	16	4.2
A24, B35, DR14	16	4.2

DISCUSIÓN

DISCUSION

El sistema HLA es uno de los mas importantes de la especie humana debido a su funcion altamente especializada de proteccion inmunologica contra los patogenos y sustancias extrañas que podrian ocasionar daño al organismo. Este sistema se caracteriza por presentar un gran polimorfismo lo cual le permite ejercer una funcion eficiente reconociendo una mayor cantidad de agentes extraños y una buena respuesta contra patogenos. Al encontrar en nuestra poblacion el 89.9% de los alelos HLA detectados reconocidos por la OMS para los diferentes locus del sistema, el cuadro N°1 demuestra la gran diversidad genetica presente en nuestra poblacion. La gran diversidad genetica observada puede ser explicada con base en nuestros orígenes y los diferentes afluentes de genes provenientes de migraciones descritas previamente (Rey *et al* 2012, Barquera 2012).

El sistema HLA en Panama habia sido previamente caracterizado mediante tecnicas serologicas (Vernaza 1997) utilizando el procedimiento de microlinfocitotoxicidad (CDC) el cual presenta poca sensibilidad y exactitud para definir el sistema HLA. La normativa internacional acepta que las de biologia molecular en este caso PCR SSP y PCR SSO son las tecnicas que definen con exactitud el sistema HLA, permitiendo ademas determinar variantes alelicas.

Los alelos HLA mas frecuentes en nuestro estudio los pudimos correlacionar con los encontrados en poblaciones vecinas. Por ejemplo, los alelos de mayor frecuencia en el locus HLA A son A*02:23 (8%) y A*24:23 (3%) ver cuadro N°2. Estos alelos representan el 47% de los alelos del locus HLA A detectados en nuestra poblacion. Estos dos alelos (A*02 y A*24) presentan similar frecuencia en los estudios realizados en poblaciones de

Colombia y Costa Rica (Avila 2010 Bermeo 2010) Similar situacion presente con el Alelo HLA B 35 el cual representa un 21.2% comparado con un 18.1% en Colombia De los alelos identificados en esta poblacion (ver cuadro N°3) Los datos que aparecen en el cuadro N°5 demuestra que el alelo DRB1*04 presenta la mayor frecuencia con un 23.6% dicho alelo tambien es el mas frecuente en las poblaciones de Colombia y Costa Rica

La alta frecuencia de algunos alelos nos permite inferir que deben existir condiciones que han logrado incrementar la frecuencia de estos La similitud entre nuestros alelos mas frecuentes y aquellos reportados en la poblacion de Colombia podria ser explicada en terminos de una parecida colonizacion tal como demuestran los historiales de migracion de ambos paises

El haplotipo (A24 B40 DR04) aparece como el de mayor frecuencia con un 6.1 % en nuestra poblacion siendo tambien el haplotipo mas encontrado en Colombia (Avila *et al* 2010) El haplotipo mas frecuente en la poblacion sueca tambien corresponde a este mismo haplotipo (Buhler *et al* 2012) Podemos observar en la figura N°6 que el haplotipo mas frecuente en nuestra poblacion esta tambien presente con alta frecuencia en otras poblaciones del continente americano no asi en los demas continentes En orden decreciente la frecuencia de los otros haplotipos fueron A24 B35 DR04 (5.0%) A02 B35 DR04 (4.2%) A24 B35 DR14 (4.2%) A24 B35 DR16 (1.8%) Cabe destacar que en nuestra poblacion se detectaron los siguientes haplotipos con una baja frecuencia A01 B57 DR07 (0.26%) haplotipo mas representativo del continente africano A01 B08 DR03 se observa con una frecuencia de (0.26 %) mientras que es el mas caracteristico en Europa

A02 B15 DR04 (0.26%) el cual es uno de los mas frecuentes en el continente asiatico. Estos tres ultimos representan los haplotipos mas frecuentes en los diferentes continentes lo que nos lleva a inferir que los encontrados en nuestra poblacion pueden proceder de esas regiones (Rey *et al* 2012). Es importante mencionar que hay haplotipos que no fueron detectado en nuestra muestra a pesar de que son de alta frecuencia en otras latitudes como por ejemplo (A02 B49 DR04) continente africano (A01 B37 DR10) continente asiatico (A02 B15 DR12) de Oceania.

La informacion obtenida al caracterizar el HLA de donantes esta lejos de servir unicamente para el caso de un paciente especifico pues la tendencia mundial se dirige a la conservacion de estos datos en los llamados bancos o registros de donantes de celulas madre. Estos bancos se valen de algoritmos de busqueda segun la tipificacion del HLA para encontrar donadores compatibles con el paciente. La mayoria de los paises desarrollados poseen uno o mas bancos nacionales de donantes de celulas y estos son a su vez integrados en un sistema internacional de intercambio de donantes el cual brinda servicio y ofrece una mayor probabilidad de encontrar un donante compatible con un paciente en distintos paises (Arrieta *et al* 2010).

Nuestro sistema de salud publica a nivel Nacional cuenta con los siguientes programas de trasplante: Trasplante Renal con donante vivo relacionado, El Programa de Trasplante Renal con Donante Fallecido, El Programa de Injerto de Celulas Pluripotenciales Hematopoyeticas en el Grupo Familiar, Programa de Donantes Voluntarios de Celulas Pluripotenciales Hematopoyeticas. La informacion generada en este estudio se podria utilizar como una herramienta valiosa para predecir cuanto tiempo puede permanecer cada

paciente en las respectivas listas de espera debido a la genotipificación HLA. También servirá para tomar medidas alternas según sea el caso particular.

Otra contribución del estudio es la determinación de alelos de baja frecuencia, información que podría ser importante en las diferentes listas de espera debido a que sería muy poco probable que el paciente sea llamado para competir por compatibilidad de un órgano donado al programa.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1 En nuestra poblacion se detecto el 89.9% de los alelos HLA reconocidos por la OMS demostrando asi nuestra diversidad genética
- 2 Hasta donde tenemos conocimientos por primera vez se tienen datos de Biología Molecular del sistema HLA en Panama
- 3 Se encontro que los alelos HLA en nuestra poblacion corresponden en mayor frecuencia a aquellos detectados en estudios poblacionales del continente americano
- 4 Se crea una base de datos del sistema HLA la cual se convertira en una herramienta valiosa para hacer pronostico de tiempo en lista de espera de los diferentes programas de trasplante en nuestro sistema de salud publica
- 5 Se detectaron en nuestro estudio alelos HLA de otros continentes comprobando genéticamente nuestra conformacion multirracia
- 6 Este trabajo se convierte en un documento que puede ser utilizado para determinar el origen genetico de algunos haplotipos HLA

AGRADECIMIENTO

AGRADECIMIENTO

En primer lugar mi eterno agradecimiento a Dios y mi familia por siempre estar presente en todos mis pasos

A la Universidad de Panama y su Facultad de Ciencias Biologicas Exactas y Tecnologias por mantener un Programa de Maestria el cual nos permite avanzar Intellectualmente en Nuestra propia tierra

Especial agradecimiento al **Laboratorio Nacional de Trasplante de la C S S de Panama”**

Profesor Alejandro Vernaza Kwiers (Director del Laboratorio especialista en Histocompatibilidad)

Lic Juan Carlos Moscoso (Especialista en Histocompatibilidad)

Licenciada Yina Gutierrez (Especialista en Histocompatibilidad)

Licenciada Elena Blake (Especialista en Histocompatibilidad)

Sr Javier A Sugar (Tecnico Asistente de Laboratorio)

Señora Irma Correa (Secretaria Ejecutiva)

Ademas agradecer a

Doctor Carlos Ramos (Profesor asesor del trabajo de Graduacion)

Doctora Magaly de Chial (Jurado de Tesis)

Doctor Tomas Diez (Jurado de Tesis)

Mil gracias a todos

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arrieta E, Salazar L. Tipificación molecular de los antígenos leucocitarios humanos, Estado del arte y perspectivas para los trasplantes de células madre en Costa Rica. Acta Médica Costarricense. 2010. ISSN 0001-6002/2010/52/1/8-15.

Ávila L, Carmona A, Franco L, Briceño I, Casas M, Gómez A. Bajo polimorfismo en el sistema de antígenos de leucocitos humanos en población mestiza colombiana. Univ. Méd. Bogotá (Colombia). 2010. 51 (4): 359-370.

Barquera Rodrigo; El papel de la genética de poblaciones en la inmunología del trasplante en México. Gaceta Médica de México 2012; 148:52-67.

Bermeo S, Guerra M, Ostos H, “FRECUENCIAS DE HLA-A, B Y DRB1 EN UNA POBLACIÓN DE HUILA-COLOMBIA”. Revista facultad de salud- junio 2010 universidad sur colombiana Neiva- Huila Vo l. 2 Nro. 1 - 2010: 9-19.

Bjorkman P, Saper M, Samraoui B, Bennett W, Strominger J, Wiley D.” The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens”.1987. *Nature* 329, 512–518.

Buhler S, Nunes JM, Nicoloso G, Tiercy J-M, Sanchez-Mazas A. "The Heterogeneous HLA Genetic Makeup of the Swiss Population.". 2012. PLoS ONE 7(7): e41400. doi: 10.1371/journal.pone.0041400.

Chang-Montegudo A, Bencomo-Hernández A, Morera-Barrios L, Ustáriz-García C, de la Guardia-Peña O, "Evolución de la nomenclatura de los factores del sistema de antígenos leucocitarios humanos". Revista cubana de Hematología, inmunología y Hemo componentes, 2014; 30(1).

Echeverría M, Rivera S, Hassanhi M, Fuenmayor A, Márquez G, González M y Zabala W. "Alelos del complejo principal de histocompatibilidad clase II DRB1*/DQB1* de la población wayúu de la Guajira venezolana." 2008. Opción, Año 24, No. 56 (2008): 44 – 66.

Goldberg A, Rizzo L,. "MHC structure and function – antigen presentation". 2015, vol.13, n.1, pp.153-156.

Gómez-casado Eduardo; Martínez-Laso Jorge;Arnaiz-Villena Antonio, El Sistema Principal de Histocompatibilidad Humano(HLA) y el Trasplante Hepático. 2015; 3: 37-50.

Granado J, Álvarez C, Lara A, Reyes M, Valdés L. Inmunogenética del Complejo principal de histocompatibilidad. Genética Clínica IV 2014.

Guzman Fulgencio M Trasplante y Rechazo Epidemiologia Molecular de Enfermedades Infecciosas 2009

Kit de tipificacion lifecodes HLA SSO para ser utilizados con Luminex

Lopez A Chavez C Granados J Funcion biologica del complejo principal de histocompatibilidad Revista de investigacion clinica 2005 vol 57 no 2 Mexico mar /abr

Marsh S WHO Nomenclature Committee for Factorsof the HLA System 2012

Martinez J Arrozola A El papel del Sistema HLA en el trasplante de celulas progenitoras hematopoyeticas Asociacion Mexicana de Medicina Transfusional 2009 38-40

Moresol F Hernandez D ¿Ha mejorado la supervivencia del injerto tras el trasplante renal en la era de la moderna inmunosupresion? Nefrologia 2013 33(1) 14 26

Nomenclature for factors of the HLA system update September 2006 Human Immunol 2006 67 1022-4

QIAamp DNA Mini Blood Mini Hand book for DNA purification from whole blood, plasma serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only), body fluids, culture cells, swabs, and tissue (QIAamp DNA Mini Kit only).

Rey D, Areces C, Enríquez M, Parga C, Abd S, Fernández M, Arnaiz A. “Los primeros pobladores de América y sus relaciones con poblaciones del Océano Pacífico según los genes HLA”. 2012. *Inmunología* ;31(3): 83-91.

Rodríguez Libia M, García Mabel García Natalia, Velásquez Laura, Paris Sara C, Álvarez Cristián M, García Luis F. “Frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas HLA-A, HLA-B, HLA-DRB1 en donantes fallecidos, Medellín Colombia”. 2007.

Solana R, Fernandez N, Gonzalez R, Garcia Jose de la Peña. Torres Sylvia Odio, Martinez Cordova Zuzet. Genetic, immunologic and environmental factors associated with autoimmunity. *Rev Cubana Invest Bioméd* .2011 vol.30, n.4 pp. 501-510.

Vernaza A, Gomes I, Diaz Issac M, Cuero C. Frecuencia de Genes y Haplotipos del sistema HLA en la población panameña, *Revista médica de Panamá* 1997.

William K Loren G Martin M Bin T Ana L Ruyan Y Qihong X Masaberg C Ng J and
Katovich C Four Locus High Resolution HLA typing in a Sample of Mexican Americans
Tissue Antigens 2009 December 74(6) 508–513